(54) PREPARATION GLUTATHION

(11) Kokai No. 54-122793 (43) 9.22.1979 (19) JP

(21) Appl. No. 53-28008 (22) 3.10.1978

(71) TANABE SEIYAKU K.K. (72) ICHIROU SENHATA(2)

(52) JPC: 36(2)D25 (51) Int. Cl<sup>2</sup>. Cl2D13/00

PURPOSE: To prepare glutathion in high purity and yield, by the enzymatic reaction in the presence of an addition compound of a soluble polymer carrier with adenosine

5'-triphosphoric acid, and acetylphosphoric aicd.

constitution: Adenosine-5':triphosphoric acid (ATP) is converted to an ATP analog by introducing a spacer such as alkylenediamine, aminocarboxylic acid, etc., and bonded to a soluble polymer carrier such as dextrane with covalent bond. L-Glutamic acid, L-cysteine, glycine, and 1.5 times amount, based on the ATP, of acetylphosphoric acid are dissolved in a buffer solution having a pH range of 5~8, and made to react with anf enzyme liquid having glutathion-synthetase activity and acetoxynase activity at 25~50°C. Since the ADP converted from ATP is quantitatively regenerated to the ATP, the reaction proceeds in high efficiency, and the glutathion can be easily separated and recovered

(54) PREPARATION OF L-GLUTAMIC ACID

(11) Kokai No. 54-122794 (43) 9.22.1979 (19) JP

(21) Appl. No. 53-28821 (22) 3.14.1978

(71) KYOWA HAKKO KOGYO K.K. (72) RIYOUICHI KATSUMATA(1)

(52) JPC: 36(2)D251

(51) Int. Cl<sup>2</sup>. C12D13/06

PURPOSE: To enable high yield production of L-glutamic acid even in a medium containing excess biotin, by culturing a specific variant induced from L-glutamic acid-producing bacteria belonging to Corynebacterium or Brevibacterium genus.

CONSTITUTION: A lysozyme-sensitive strain such as corynebacterium glutamicum KY9703, KY9705, T339 or T327 (FERM-P No.4412, 4413, 4789, or 4790) induced from Corynebacterium glutamicum ATCC13032, or Brevibacterium flavum KY9733 (FERM-P No.4414) induced from Brevibacterium flavum ATCC14067, is inoculated in a nutrient medium, and aerobically cultured at pH6~9 and 24~37°C. Even if the medium contains excessive biotin, the production of L-glutamic acid is not inhibited, and the L-glutamic acid can be obtained in high yield.

(54) PREPARATION OF COENZYME Q10

(11) Kokai No. 54-122795 (43) 9.22.1979 (19) JP

(21) Appl. No. 53-28603 (22) 3.15.1978

(71) ASAHI KASEI KOGYO K.K. (72) SHINICHI FURUKAWA(2)

(52) JPC: 36(2)D33;36(2)C04

(51) Int. Cl<sup>2</sup>. C12D3/02,C12D13/10

PURPOSE: To produce coenzyme Q<sub>10</sub> having excellent pharmacological activity such as abatement of cardiac insufficiency, etc., at low cost, by culturing coenzyme Q<sub>10</sub>-producing bacteria belonging to Brettanomyces genus, and separating the

coenzyme Q<sub>10</sub> accumulated in the bacterial cells.

CONSTITUTION: Coenzyme Q<sub>10</sub>-producing bacteria belonging to Brettanomyces genus, e.g. Brettanomyces anomalus IFO0642, are cultured in a nutrient medium at pH4.5~7.5 and 25~35°C for 1~10 hours under shaking or under aeration and agitation. After culturing, the bacterial cells are collected, and saponified with an alcoholic alkali. The coenzyme Q<sub>10</sub> is extracted from the saponified cell with an organic solvent, and factionated and purified by adsorption chromatography or thin-layer chromatography. The coenzyme Q<sub>10</sub> is a compound of formula wherein n is 10.

## (9日本国特許庁(JP)

①特許出願公開

# ⑩公開特許公報(A)

昭54-122794

⑤ Int. Cl.²C 12 D 13/06

識別記号 🤅

砂日本分類 36(2) D 251 庁内整理番号 ❸公開 昭和54年(1979)9月22日

6760-4B

発明の数 2 審査請求 未請求

(全 6 頁)

**ᡚ**レーグルタミン酸の製造法

20特

顧 昭53—28821

220出

頭 昭53(1978)3月14日

⑫発 明 者 勝亦瞭一

相模原市文京 1 -13-8

⑫発 明 者 高山健一郎

厚木市鳶尾1丁目9番10号

切出 願 人 協和醗酵工業株式会社

東京都千代田区大手町一丁目6

番1号

剪 糊

/ 発明の名称

L - グルタミン酸の製造法

#### 2.券許請求の監選

- (1) コリネバタテリウム属またはプレビバタテリウム属に属する截生物を培地に培養してエーグルタミン酸を培地中に審積させ、これを採取する方法にかいて、リゾテームに感受性を有し、培地中に存在するビオナンによつてエーダルタミン酸の生産が抑制されない自体を用いるととを特徴とするエーグルタミン酸の乳産法。
- (2) コリネパチテリウム属またはプレビパクテ リウム属に属し、リゾテームに感受性を有し 通知の 培地中に存在するとオテンによつてムークル メミン酸の生産が抑制されない性質を有する 数年悔。
- (3) 放棄生物がコリネバタテリウム・グルタミ クム主たはプレビバクテリウム・フラブムに

機丁る関係から過ばれる特許請求の範囲2の 像生物。

#### よ発明の幹細な説明

本発明はコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する後生物を培地に培養してムーグルタミン酸を培地中に審検させ、これを採取する方法において、リゾテームに感受性温度ので有し、培地中に存在する人ピネテンによつてムーグルタミン酸の生産が抑制されない資体を用いることを特徴とするムーグルタミン酸の製造法に関する。

3字加入

特開 昭54-122794(2) 以下本発明をさらに詳細に説明する。

本発明によればコリネバタテリウム真宝たは プレビバクテリウム属に属し、リゾナームに感 受性を有し、培地中枢存在するパピオテンによつ 3字加入 てムーグルタミン酸の生産が抑制されない性質 を有する最生物を増進に培養すれば培地中にし - グルタミン酸が岩積するので、これを採取す るととにより高収率にも一ダルチミン酸が得ら

本発明に用いる数生物はコリネパクテリウム 属またはブレビバクサリウム属に異し、リゾナ 通報の ームに暴交性を有し、培地中に存在するピオナ 3字加入 ンによつてL-グルタミン酸の生産が抑制され ない性質を有する微生物であればいかをる面投 をも用いるととができる。一般にはコリネパク テリクム属さたはプレビバタテリクム異に属し、 ユーグルミミン酸生産能を有する資体を模株と し、とれを変異質導処理して得られた変異なか らリゾチームに感受性を有するものを選択し、 とれを用いる。安兵師等の方法としては、紫外

生育にピオチンを要求するルーグルタミン酸 生産側のなっグルタミン酸生産性は焙油中のビ オチン書屋と極めて密袋な隣係があり、生育に 対して製品量のピオテン機関のときはじめてエ - グルタミン便を生産できる。一方安価を培地 の根原料として利用される展標書壁台加水分解 物などはビオチンを多量に含有している。とれ 5粗原科を含有する培地K L - グルチミン酸生 産貞を培養する方法としては特公昭37-16 タよ号公報、特公昭38-23288号公報な どに記載されている方法が知られているが、工 楽的にはさらに侵れた方法が望まれている。

本発明者らは、安備な租原料を用い、過剰量 のピオナンの作用を回避しても・グルメミン験 を製造する方法につき研究した結果、従来のよ --グルタミン酸生産菌を親株として安異師導し たりゾチームに感受性を有する変異株を用いれ ば、過剰のビオテン含有培地を用いても、ビオ チンによる抑制を受けるととなく高い収率でも - グルタミン酸を生産できることを見出した。

毎限射、放射蘇原射、変異勝起剤処理等の過常 の方法が用いられる。変異酵導された変異株か らりゾテームに感受性を有する盲株を選択する には、葉株が生育可能な優度のリンテームを含 有する培地で生實できなくて、リゾチーム無磁 加塔地では雑株と同様に生育できるものを過べ ばよい。従つて、ことでリゾチームに感受性で あるとは、リゾテームに対する最小阻止養匙が 銀株よりも低いことを意味する。また培地中に 過剰の 存在する人ピオチンによつてL-グルセミン酸の 生意が抑制されないとは、培地中に存在する人と オテンによるL-グルタミン散生産の抑制が実 質的に無視できる程度のものであることを意味 する。具体的には前記のごとき租原料を用いた 海刺の うけるととなく L-のみえン酸の生物が 場合でもだまテンドエる影響を振揚できること を意味する。

本発明に用いる具体的に好道な菌株の一例と しては、コリネバクテリウム・グルタミタム ATCCI3034を選択として得られたコリ キパクテリウム・グルタミクムをエタクロヨ

( 像工研寄託受益番号第44/2号、 HRRL / / 47 / )、コリネパタテリウム・グルタミ クム&ミタフのよ(鉄工研寄託受避番号第44 ノる号、FRRLノノスクス)かよびプレビバ クテリウム・フラブムATCCI#067を選 株として得られたプレビパクテリウム・フラブ ムエリタク33(做工研客託受選番号第4414 号、MRRL!!ュフォ ) がおげられる。

コリネパクテリウム・クデタミクムATCC

1. / 3 032を製株としてリゾナーム感受性変異株 1 を取得する方法について以下具体的に説明する。 (極度製薬社集) 放業株を粉末ブイヨン人208/4かよび酵母エ 『宇加入 キスタタ/ & の組成を有する培地( 殺闘前 PH <sup>7.2</sup>、以下C培地という)に被償しよのでで扱 重培養する。中期対数期で培養を中止し、集賞 し、生選会塩水で発浄後、14/20 トリス・マレ ート最情報(PH LO)によ×!の「排版/wi になるように暴潤する。との最積液に最終過度 300 49/11 になるようにニトロソクアニツン

を加え、ユダビで30分類放電し、強心分離に

特開昭54-122794(3)

より関体を集め、同一級需要で関体を洗浄後、 生組会塩水に最適し、適宜生理会塩水で着取し て C 培地にさらに 3 9 / 4 の寒天を含む固体培 地 (以下 C A 培地という)に並りつける。 これ を 3 0 ℃で 3 日間培養し、生じたコロニー (約 4 0 0 0 )を次の3 程額の固体培地にレブリカ 法により強りつける。

- ① C▲培地
- ③ C L A 培地: C A 培地を加熱敷留後、冷却して培地の温度が4 3 でまで下がつてから200回/1になるようにリゾナームを括加した培地。

について銀枠と比較した結果を第 / 表に示す。 3 種類の個体培地上での生育はレブリカ法で施 りつけ、3 0 でで3日間培養後程定した。 長中 生育側の+は密の生育が観察されたものを、 ~ は生育が観察されなかつたものを示す。また表 中リゾチーム感受性は次のように試験した。す なわちに培地にて3 4 時間 3 0 で液体振量培養 した感を集画後、生理食塩水にて適当に看釈し て簡体の動物核をつくる。

との懸滑液 / 0° 細胞相当を倍々系列の最度の リゾナームを含有する c ▲ 培地に属下装置し、 よりででよ日間培養する。 質の生育がまつたく 個 められない意小のリゾナーム最底を贈のリゾナーム感受性値(最小生育阻止最度)とした。 マオテン30 AS/8、サイアミン塩酸塩/サ/8、システイン塩酸塩20 取/8 ンよび寒天208/8の組成を有する培地(設置的pic 7.0)。

30でで3日間培養後、CA培地で生育し、CIA培地で生育しない菌をリンテーム感受性変異株として得る。MA培地で薬株と同様化生育する自己栄養性でリンテー人に対して感受性の変異株は試験したムの00コロニーの中にノノの機得られた。このノノの株中ノフ株中ノフ株のナン連舞培地でも多量のLーグルのミンテリウム・グルのミクムエエタアの3かよびエアアの1かくして得られた変異株の一側である。ブレビバクテリウム・フラブムAICCノギのイブを報株とする変異師等も上配と同様に行つて、ブレビバクテリウム・フラブム EIFアフ33を得た。

上記例示の変異像のMA培地、CA培地、CA培地、CA培地、CA培地での生育なよびリゾテーム感受性度

第/表

選 徐	生		Ħ	リンテーム島受性意	
	MA均地	CA培地	CLA 培地	(MIC AS/M)	
コリネノタテリクム・					
TNORTH					
KY 9703	+	+	-	100	
KY 9703	+	+	-	2 5	
ATCC /3032	+	+	+	\$00	
プレビベタテリウム・		`			
アラブム					
KY 9733	+	<b>、</b> +	- 1	. 50	
ATCC /#067	+	+	+	£ 0 0	

本発明の仮生物を培養するための培地は、炭素源、窒素源、無様化合物、その他の栄養素を適当に含む培地を与ば、通常エーダルタミン酸生産に用いられる天然培地、合成培地のいずれも使用できる。たとえば炭素源としては廃棄、ブドウ糖、糖素をどの種質 かよび 段齢権 化液などが、窒素源としてはアンモニア、 健康アンモニウム、塩酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、

特期昭54-122794(4)

適宜使用して行うととができる。

以下に本発明の実施例を示す。

### 実施例 /

グルコース 408/8、(NH+)280。 28/8、 Mg804.7830 ass/4, KH3PO4 ass/4, Kanpo, /F/A, Feso, -7H20 2m/A, Maso, -#8.20 20/4、サイアミン塩酸塩 /四/4、フェ ノールレッド 104/4かまびピオテン 289/4 あるいは / 00 μ8/8 の組成を有する培地を調製 し、pHをスのに調整した後、30叫ずつ300 **お客の 枝 付フラスコに入れ、ノノメででノメ** 分間加熱殺菌した。冷却後、別に加熱殺菌した **泉業液を48/4だなるように添加した。との** 培地に第3裂に示した菌を接種しょりでで振慢 培養を行つた。培養中培養液を PH ムよ~4 0 に保つため/ 3時間目と20時間目の2回風象 液を48/4になるように終加し、3.2時間で培 養を終了した。かくして培養液中に蓄積した立 グルチミン散量は、第4表に示す通りである。 培養療!』から個体を除去し、繊維し、塩酸で

水酸化アンモニウム、タエン酸アンモニウム、 酒石酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、尿素 などの有機無模窒素化合物、ペプトン、肉エキ ス、コーンスチーブリカーなどの天然栄養療な どが、無機化合物としては頻酸第一カリ、爆酸 第二カリ、硫酸カリ、硫酸マグネンウム、塩化 マグネシウム、硫酸酸一鉄、塩化解二鉄、硫酸 マンガン、塩化マンガンなどが、その他の栄養 派としてはピオチン、サイブミンなどが用いら れる。

培養は扱量培養、通気操养培養をどの好気的 条件で行い、培養温度はユギー3 7 ℃とくに ユミー3 3 ℃が好温である。培養中は適当な中 和剤を用いて PB を 6 ~ 9 に関数するのが好ま しい。培養は / ~ 3 日間行えば培養液中に著量 の L - グルタミン酸が生成需要する。培養液か らの L - グルタミン酸の採取は、関体を除去し た上情液から、イオン交換機関による優麗者法、 機能品析法、特電点品析法をど、従来の L - グ ルタミン酸の製造にかいて常用される語方法を

PB よるに調整し、冷却してレーグルタミン酸の組結晶を得た。組結晶の量( 9 )を括弧内に・示す。

第2表

<u> </u>		レーダルチミン酸蓄液量 号/出			
復 株		xx+22#8/8	EXTY/0008/6		
		<b>委加培地</b>	"添加培地		
コリネ・タテリウ	ト・グルタミクム				
EXP	703	2/(47)	R3(4P)		
KYF	705	/KS(/Q7)	140(104)		
ATC	:/3032	20	as		
プレヒパタテリウ	ム・フラブム	-EF(EF)	- == ( 4.2 )		
ETF	733	EF (4.F)	8.F( <u>4.2</u> )		
ATC	14067	7.4	a/		

#### 突施何 2

実着例/で用いた培地中グルコースを甘画店 需要(グルコースとして #08/8 相当量) に換 え、加熱設置後の培地を PB 7 0 に再調整する 以外は実施例/と同様に行つた。培養液中に審 表した L - グルタミン設量を第3表に示す。

終し親

重 株	ユーダルタミン酸等模: (四/Ħ)
コリネ・タテリウム・ダルタミクム	
KT9703	1 1.2
ETSTOS	126
ATCC/3082	Q 3
プレビンタテリウム・フラブム	
KT9733	2.7
ATCC/#067	a.2

特許出順人 (102)協和強勢工業株式会社 代表者 高田 弘

16

特開昭54-122794(5)

昭和54年3月22日 适

**特許庁長官·** Li

1. 事件の表示

昭和55年特許團第28

2 発明の名称

L-グルタミン酸の製造法

3 補正をする者

特許出顧人 〒100 事件との関係

生

東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 (102) 協和嚴鄙工業株式会社

祝

4. 補正の対象

明細省の発明の詳細な調整は重中上び特許

5. 補正の内容

1) 明細書類 6 頁 4 行目の「および」を削除し 次の配載を加入する。

コリネベクテリウム・グル

「およびプレヒパクテリウム・サンカロリテ イクム ATOO 5 4 Q 4 6 」を加入する。

- 5) 明細書館 8 頁 1 8 行目の「3 3」の後に 「およびプレヒバクテリウム・サッカロリテ イクムT521」を加入する。
- 6)

「コリネベクテリウム・グルタミクムエ 3 5 9 ( 後工研容託受理番号第 4 7 8 9 号、 HRRL 8-11433 )、コリネベクテリウム。 グルタミクム1527(飯工研客託受理番号 **第 4 7 9 0 号、 WRRL B-11 434** )、コリネ パクテリウム・リリウム ATCC 15990か ら誘導されたコリネパクテリウム・リリウム 〒322(微工研新託受理番号館#79/号、 NRRL 8-11435) . 1

2) 明細書第4頁8行目の「HRRL 11275 )」の 後に次の記載を加入する。

「およびプレピペクテリウム・サッカロリ テイクス ATCC 14066から誘導されたプ レビバクテリウム・サフカロリティクムな 3 2 1 ( 微工研密託受理番号館 4 7 9 2 号、 MRRL 8-11436 ) ]

- 3) 明細書館8頁13行目の「および」を削除 し、何14行目の「05」の後に「エ339 およびする27」を加入する。
- 4) 明細書第8質16行目の「067」の後に

生 胃 第二次 19:50 19:

	7 559	+	+	<b>±</b>	400
明細書集10頁第1表を次の通りに訂正す	T 527	+	+	-	200
	XX 9.705	+	+	-	190
,	ET 9705	+	+	-	25
	ATCC 15052	+	+	+	800
	コリネ・タテリウム・ラリウム				
	T 522	+	+	-	50
	ATO0 15990	+	+	+	400
	ブレビ・1クテリウム・フラ ブム				
· ·	EY 9785	+	+	_	50
./	ATOG 14867	+	+	+	800
	プレビバタテリウエ・テン カロリテイタム				
	T 521	+	+	-	180
	ATGC 14066	+	+	+	800
	·		<u> </u>		

特開昭54-122794(6)

7) 明細 第14頁第5要の後に次の「実施例 <sup>3</sup> 」を加入する。

「実施务3

使用商株を第4要に示す菌株に替えて行う 以外は実施例(と同様に行つて第4表に示す 「量の L"- グルタミン酸の蓄積を見た。

館 4 寿

	L-グルタミン保護検量(FE/S)			
樹 . 休	ピオテン 2 #8 / 6 転加培地	ビオテン 180 FS/4 形加 培地		
コリネベクテリウム・グルタミクム				
T 559	2.5	- 110		
T 527	10.5	130		
ATOO 15032	9.0	- 0, 2		
コリネバクテリウム・リリウム				
T 522	20	100		
ATCC 15998	8.5	<b>4</b> 1		
ブレビジテリウム・サフカロリテイクム	1			
T 821	1 0.5	1 LQ		
ATCC 14066	2.5	0.2		

特許 請求の範囲

- (1) コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属する微生物を培地に培養してLーグルタミン酸を培地中に審積させ、これを採取する方法にかいて、リンテームに感受性を有し、培地中に存在する過剰のビオテンによつてL-グルタミン酸の生産が抑制されない関係を用いることを特徴とするL-グルタミン酸の製造法。
- (2) コリネパクテリウム属またはプレビパクテリウム属に属し、リゾテームに感受性を有し、 特地中に存在する過剰のピオテンによつてエ - グルタミン酸の生産が抑制されない性質を 有する数生物。
- (3) 弦像生物がコリネベクテリウム・グルタミ クム、コリネベクテリウム・リリウム、ブレ ピベタテリウム・フラブムまたはブレビベタ テリウム・サフカロリティクムに属する菌体 から退ばれる特許請求の範囲2の微生物。
- (4) 眩暈生物がコリネベクテリウム・グルタミ

8) 許請求の範囲を別紙の造りに訂正する。 4級付書類の目録

微生物保管委託申請書受理委号第一写(通

K Y 9 7 0 5 ( 做工研寄託受理委号部 12、 MRRL 11271)、コリネベク テリウム・グルタミクムET9705(数工 研寄託受選番号第4415、MRRL 1127 2)、コリネベクテリウム・グルメミクムで 3 5 9 ( 依工研寄託受理委号第4789 、 MRRL B-11433 ) . コリネベクテリウム・ グルタミクムエる27(仮工研寄託受理番号 <u>第4790</u>、 HRRL B-11434)、コリネパ クテリウム・リリウムで522(食工研寄託 受職番号第 # 7 9 / 、 ERRL 8 - // 435 )、 ブレビバクテリウム・フラブムET9755 ( 徽工研寄能受查番号第 4 4 1 4 、 MRRL 1 1 2 7 5 ) およびプレビバクテリウム・サ ツカロリティダム 優工研寄託交易番号館 学加入 \*ファス、 MRRL B-11436 )から過ばれる 特許請求の範囲 5 の 数生物。